

**SPECIFICITES DES MOLLUSQUES, CONDITIONS DE
MISE EN OEUVRE CHEZ L'HUITRE CREUSE
CRASSOSTREA GIGAS
A L'ECHELLE DE L'ECLOSERIE ET PREMIERS
RESULTATS DE TERRAIN**

A. GERARD

IFREMER - Unité de Recherche en Génétique et Eclosion
BP. 133 - 17390 La Tremblade - FRANCE

1. INTRODUCTION

L'effort de reproduction chez *Crassostrea gigas*, comme pour la plupart des mollusques bivalves est prioritaire sur la croissance somatique. Dès le début du printemps, le métabolisme énergétique est principalement orienté vers la gamétogenèse au détriment des réserves glucidiques, induisant ainsi un ralentissement de la croissance et une modification des qualités organoleptiques de la chair (Héral & Deslous-Paoli, 1983). Ces mêmes auteurs ont montré que cet effort augmente avec l'âge (figure 1). Chez les jeunes huîtres de 1 an, l'énergie est principalement utilisée pour la croissance, seulement 18% sont impliqués dans la reproduction, alors que chez une huître de 2 ans, 60 à 65% de l'énergie accumulée sert à la formation des gamètes (Deslous-Paoli & Héral, 1983).

Pour limiter l'impact de la gonadogenèse et afin d'essayer de réorienter ce flux énergétique vers la croissance somatique et la constitution de réserves, une des voies de recherche développée depuis une dizaine d'années vise à obtenir des individus stériles par triploïdisation. Chez les mollusques, les recherches ont surtout été initiées aux Etats Unis sur plusieurs espèces : *Crassostrea virginica* (Stanley *et al.*, 1981), *Crassostrea gigas* (Downing & Allen, 1987 ; Allen & Downing, 1986 ; 1990), *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984), *Haliotis discus* (Arai *et al.*, 1986). Ces expériences ont mis en évidence, notamment chez *Crassostrea gigas*, une stérilité partielle des individus triploïdes accompagnée d'une amélioration des performances de croissance et du

maintien d'une teneur élevée en glycogène tout au long de l'année (Allen & Downing, 1986 ; 1990).

En France, cette technique a surtout été développée dans le domaine piscicole par l'INRA. La production de poissons triploïdes a ainsi permis d'obtenir des gains de croissance (Chourrou, 1989) et une stabilité de la qualité de la chair (Chevassus, 1987) résultant d'une réduction de l'activité gonadique. Chez les mollusques les recherches ont surtout été approfondies depuis la création de l'écloserie IFREMER de La Tremblade, notamment dans le cadre d'un contrat de plan Etat-Région Poitou-Charentes qui prévoyait d'appliquer les techniques de triploïdisation aux principales espèces françaises d'intérêt commercial : l'huître creuse *Crassostrea gigas*, l'huître plate *Ostrea edulis*, la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* et la palourde européenne *Ruditapes decussatus*.

2. CONTROLE DU SEXE.

Aucun chromosome sexuel n'a été découvert chez les bivalves, ils possèdent potentiellement les deux sexes. Cette bipotentialité se traduit par l'existence d'un hermaphrodisme juvénile (Lubet, 1991). La majorité des espèces sont par la suite gonochoriques (sexes séparés), mais diverses modalités d'hermaphrodisme sont observées, en particulier chez les espèces qui nous intéressent, les Ostréidés. Chez les huîtres larvipares (l'huître plate *Ostrea edulis*), l'hermaphrodisme est asynchrone, les lignées mâles et femelles sont déphasés, et plusieurs cycles peuvent se dérouler au cours d'une même année de reproduction. Chez les huîtres ovipares, comme *Crassostrea gigas*, l'hermaphrodisme est également asynchrone, mais les huîtres peuvent changer de sexe d'une année sur l'autre (hermaphrodisme alternatif). Les mécanismes physiologiques contrôlant le déterminisme des changements de sexe sont encore peu connus, il est donc pour l'instant impossible d'avoir un réel contrôle sur le sexe.

3. PRINCIPE DE LA TRIPLOIDISATION CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES.

3.1. Spécificité des mollusques.

L'induction de la triploïdie est fondée sur l'inhibition d'une division cellulaire. Une des spécificités des mollusques par rapport aux poissons réside dans le fait que les ovocytes sont expulsés en fin de prophase ou au début de métaphase de la première division méiotique. Les deux divisions de maturation sont donc théoriquement accessibles au traitement par un antiméiotique, contrairement aux poissons où seul le deuxième globule polaire peut être retenu. La rétention du

premier ou du second globule polaire (GP1 ou GP2) conduit à deux types de triploïdes, le taux d'hétérozygotie sera plus élevé chez les individus issus de la rétention du GP1. Les performances physiologiques de ces deux types de triploïde sont actuellement à l'étude dans le cadre d'un programme CEE réalisé en collaboration avec le Plymouth Marine Laboratory et l'Université de Crète.

3.2. Induction de la triploïdie.

La triploïdisation peut être obtenue par:

- la rétention d'un des deux globules polaires en soumettant les oeufs, quelques minutes après la fécondation, à des chocs physiques (température, pression) ou à un traitement chimique (Figure 2),
- le croisement d'un individu diploïde (2N) avec un individu tétraploïde (4N) qui engendre des individus triploïdes (3N). Cette méthode, qui est la plus fiable et qui évite le traitement des oeufs à chaque génération, ne sera applicable que si des tétraploïdes viables et fertiles sont obtenus chez les mollusques.

L'induction chimique à la cytochalasine B (CB) est actuellement la technique la plus couramment appliquée chez les mollusques, elle semble fournir les plus forts taux de triploïdes (Beaumont et Fairbrother, 1991). Son efficacité dépend de la concentration, de la température, de la durée et du moment d'application du traitement. Ces paramètres qui sont fonction de la biologie et du développement embryonnaire doivent être déterminés pour chaque espèce.

3.3. Résultats obtenus à La Tremblade.

Les techniques d'induction de la triploïdie utilisant la Cytochalasine B sont désormais maîtrisées en ce qui concerne l'huître creuse *Crassostrea gigas* (Diter, 1990). Elles ont été développées pour les trois autres espèces étudiées dans le cadre du plan Etat-Région Poitou-Charentes : l'huître plate *Ostrea edulis* (Gendreau & Grizel, 1990), la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Dufy & Diter, 1990 ; Diter & Dufy, 1990) et la palourde européenne *Ruditapes decussatus* (Gérard *et al.*, 1994c).

Récemment, le laboratoire de La Tremblade a mis au point une nouvelle méthode d'induction, basée sur l'utilisation du 6-Diméthylaminopurine (6-DMAP) (Desrosier *et al.*, 1993 ; Gérard *et al.*, 1994a). Cette substance présente de multiples avantages par rapport à la CB (figure 3) :

- son utilisation ne requiert pas de solvant puisqu'elle se dissout directement dans l'eau de mer,

- elle ne fait pas partie de la liste des substances hautement toxiques,
- elle est tout aussi efficace en matière d'induction de la triploïdie,
- elle est moins toxique, les survies embryonnaires et larvaires sont très nettement supérieures,
- elle est beaucoup plus économique.

3.4. Contrôle de la ploïdie.

Juger rapidement de l'efficacité d'un traitement de polyploïdie, est une opération nécessaire au niveau de la recherche afin d'optimiser les traitements d'induction, et au niveau des écloséries industrielles pour vérifier les taux de triploïdie dans les élevages larvaires et au moment de la vente du naissain. Différentes méthodes sont employées chez les mollusques pour établir ces taux de polyploïdes : l'analyse caryologique, le comptage des globules polaires, la cytométrie de flux, la microfluorimétrie, la mesure du volume nucléaire par compteur Coulter ... Si l'on se réfère à la revue de Beaumont & Fairbrother (1991), le comptage de chromosomes et la cytométrie de flux sont les techniques les plus couramment utilisées, la première impose de longues heures de lecture au microscope et n'est pas utilisable à toute période de la vie du mollusque, et la seconde nécessite un matériel très onéreux.

Pour simplifier et améliorer cette opération de contrôle, le laboratoire de La Tremblade a recherché et mis au point pour les bivalves, une nouvelle technique basée sur la mesure par imagerie numérique du contenu d'ADN de cellules colorées au Feulgen (Gérard *et al.*, 1991, Gérard *et al.*, 1994b). Cette technique très fiable, développée dans le milieu médical pour la cancérologie (figure 4), permet désormais de contrôler à tout moment la ploïdie d'un bivalve. L'analyse s'effectue sur des populations cellulaires pour les gamètes, les embryons, les larves et post-larves (figure 6), et, individuellement pour les juvéniles et adultes (figure 5). A ce stade, elle peut être réalisée sur un morceau de branchies prélevé par biopsie, et permet ainsi un tri des animaux.

3.5. Transfert à la profession.

En 1993, deux stages ont été organisés à La Tremblade pour les écloséries industrielles. Le premier avait pour objet de faire une mise au point sur les techniques d'induction de la triploïdie, le deuxième a été consacré au contrôle de la ploïdie par imagerie numérique.

4. CONTROLE DES PERFORMANCES BIOLOGIQUES.

4.1. Réseau Génétique Mollusques.

Hormis les travaux d'Allen & Downing (1986 ; 1990), on trouve peu d'études consacrées au contrôle des performances biologiques sur le terrain. Cette phase, pourtant essentielle, est réalisée en France dans le cadre du Réseau Génétique Mollusques (REGEMO) de l'IFREMER. Ce réseau est constitué par l'écloserie de La Tremblade et la nurserie de Bouin pour la phase de production des populations diploïdes et triploïdes, de laboratoires côtiers pour tester la variabilité des performances en fonction des sites et des pratiques culturales et de laboratoires thématiques de l'IFREMER, du CNRS ou d'Universités pour des études précises en physiologie, histologie de la reproduction,...

Au niveau national, ce réseau est organisé autour de deux cellules (figure 7):

- une cellule de base comprenant l'écloserie de La Tremblade, la nurserie de Bouin, et les claires expérimentales de Bouin et de La Tremblade (URGE et URRRA). Cette cellule assure l'élaboration des principaux plans d'expériences, la production de toutes les souches ou lignées, et le contrôle des performances biologiques dans des conditions de milieu d'élevage et de traitements zootechniques aussi homogènes que possible,
- une cellule plus spécialisée dans le contrôle des performances biologiques incluant la participation de tous les laboratoires côtiers pour tester la variabilité des performances en fonction des conditions de milieu, et de laboratoires de l'IFREMER, du CNRS ou d'Universités pour des études précises en physiologie, histologie de la reproduction, analyse sensorielle...

4.2. Premiers résultats sur *Crassostrea gigas*.

4.2.1. Stérilité.

La stérilité peut être classée en trois grandes catégories (Chevassus, 1983):

- gonadique : les gonades ne se développent pas,
- gamétique : les gamètes sont anormaux, rares ou les deux,
- zygotique : les gamètes sont viables et la fécondation est possible mais ne donne que des larves non viables.

Les triploïdes de *Crassostrea gigas* ne se classent pas clairement dans une de ces catégories. Les gonades, bien que réduites sont présentes chez les triploïdes. Allen & Downing (1986) ont estimé que la production de gamètes des triploïdes est réduite de 50% chez les mâles et de 75% chez les femelles. Les travaux réalisés à La Tremblade montrent qu'en réalité, il existe une grande variabilité dans le type de stérilité observé au sein d'une même population de triploïdes, variabilité qui explique en partie la plus grande hétérogénéité des performances biologiques enregistrées dans le milieu naturel. En 1994, un programme d'étude du potentiel reproductif des triploïdes de *Crassostrea gigas* sera conduit à La Tremblade en collaboration avec S.K. Allen.

4.2.2. Evolution des paramètres biométriques et biochimiques.

Un premier suivi de populations diploïdes et triploïdes de *Crassostrea gigas* a été réalisé, entre 1990 et 1992, sur estran en Normandie (Gouletquer *et al.*, 1993) et dans des claires de La Tremblade. Les résultats confirment que les huîtres triploïdes présentent des caractéristiques biométriques et biochimiques supérieures à celles des huîtres diploïdes dès que le processus de gamétogenèse est entamé. Toutefois ces premiers résultats intéressants doivent être tempérés par les données de survie qui ont été nettement en défaveur du lot triploïde et par une plus forte hétérogénéité en taille de ce même lot.

Au printemps 1993 une nouvelle opération de contrôle des performances a débuté dans différents sites du littoral français : Port-en-Bessin, Bouin, La Tremblade, Arcachon et Palavas. Les résultats en fin de première année ne font apparaître des différences significatives que dans le seul site d'Arcachon où l'impact de la reproduction a été le plus fort (figure 8 à 13). Ces huîtres n'étant âgées que d'un an, ces observations ne sont pas surprenantes puisque les performances des triploïdes ne deviennent supérieures à celles des diploïdes qu'après une réelle période de maturation. Un bilan complet sera réalisé à la fin de 1994, après une deuxième année de contrôle.

5. BIBLIOGRAPHIE

Allen, S.K., Jr., & Downing, S.L., 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **102** : 197-208.

Allen, S.K., Jr., & Downing, S.L., 1990. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* : Gametogenesis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**, 1213-1222.

Arai, K., Naito, F. & Fujino, K., 1986. Triploidization of the Pacific abalone with temperature and pressure treatments. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **52** : 417-422.

Beaumont, A.R., & Fairbrother, J.E., 1991. Ploidy manipulation in molluscan Shellfish: a review. *Journal of Shellfish Research*, vol.10, N°1,1-18.

Chevassus, B., 1983. Hybridization in fish. *Aquaculture*, **33** : 245-262.

Chevassus, B., 1987. Caractéristiques et performances des lignées uniparentales et de polyplœides chez les poissons d'eau froide. In *Proc. World Symp. on Selection, Hybridization and Genetic Engineering in Aquaculture*, Bordeaux 27-30 May, 1986. Vol. II, K. Tiews Ed., Berlin, PP. 145-161.

Chourrout, D., 1989. Gynogenèse, polyplœidie et transfert de gènes chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, 60p.

Deslous-Paoli, J.M., & Héral, M., 1988. Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquat.Living Resour.*, **1**, 239-249.

Desrosier R., Gérard A., Peignon J.-M., Naciri Y., Dufresne L., Morasse J., Ledu C., Phelipot P., Guerrier P. & Dube F., 1993. A novel method to produce triploid embryos in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 170:29-43.

Diter, A., 1990. Reproduction uniparentale et polyplœidie induites chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) et chez les bivalves *Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* et *Clamys varia*. Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI, 88p. et annexes.

Diter, A. & Dufy, 1990. Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. II Chemical induction of tetraploid embryos., *Aquac. Liv. Res.*, **3** : 107-112.

Dufy, C. & Diter, A., 1990. Polyploidy in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. I - Chemical induction and larval performances of triploids. *Aquat. Liv. Resour.*, **3** : 55-60.

Downing, S.L. & Allen, S.K., Jr., 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* : optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. *Aquaculture*, **61** : 1 -15.

Gendreau, S. & Grizel, H., 1990. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L.. *Aquaculture*, **90** : 229-238.

Gérard A., Peignon J.M. & Chagot D., 1991. Contrôle de la ploïdie par imagerie numérique dans des expériences d'induction de la triploïdie chez les mollusques bivalves. CIEM La Rochelle. Paper C.M. 1991/F:12 réf. K.

Gérard A., Naciri Y., Peignon J.-M., Ledu C. & Phelipot P., 1994a (in press). Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture and Fisheries Management*. Mars 1993

Gérard A., Naciri Y., Peignon J.-M., Ledu C., Phelipot P., Noiret C., Peudenier I. & Grizel, H., 1994b (in press). Image analysis : A new method for estimating triploidy in commercial bivalves *Aquaculture and Fisheries Management*. Mars 1993.

Gérard A., Naciri Y., Noiret C., Ledu C., Peignon J.-M. & Phélipot P., 1994c (in press). Induced triploidy in the European clam *Ruditapes decussatus* (L.) and performance of triploid larvae. *Aquaculture*. Mai 1993.

Gouletquer P., Joly J.P., Gérard A., Le Gagneur E., Moriceau J., Peignon J.-M., Heurtebise S. et Phelipot P., 1993. Performance of triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem : survival, growth, and proximate biochemical composition.. ICES statutory meeting 1993, Dublin, Mariculture Committee, 1993/F:24.

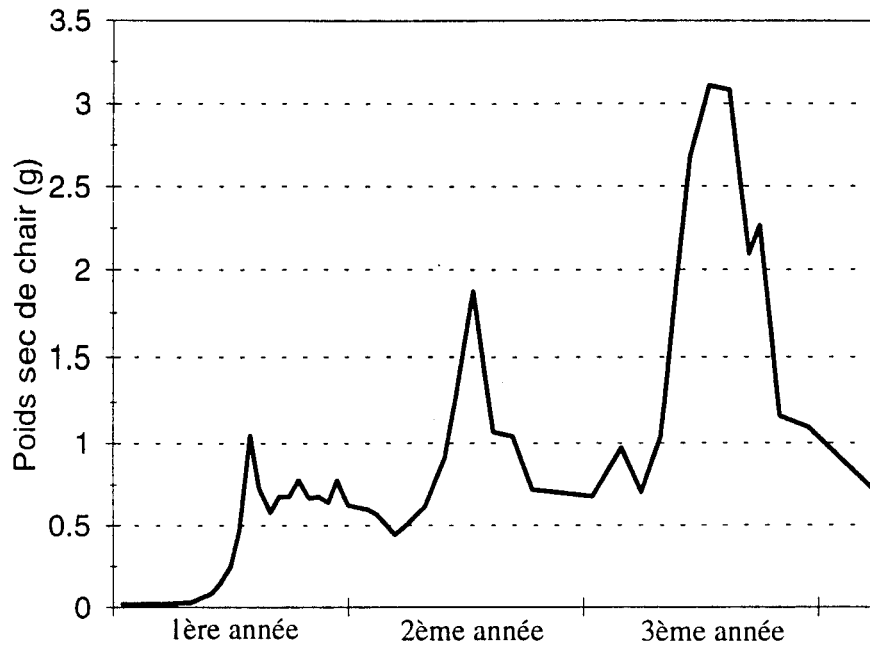
Héral, M., & Deslous-Paoli, J.M., 1983. Valeur énergétique de la chair de l'huître *Crassostrea gigas* estimée par mesure microcalorimétriques et par dosages biochimiques. *Oceanol. Acta*, 1983, 6(2) : 193-199.

Lubet, P., 1991. Reproduction des mollusques. *Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture*. G. Barnabé Coordonateur. Lavoisier - Tec & Doc, Paris, XVIII-500p.

Stanley, J.G., Allen, S.K., Jr. & Hidu, H., 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. *Aquaculture*, 23: 1-10.

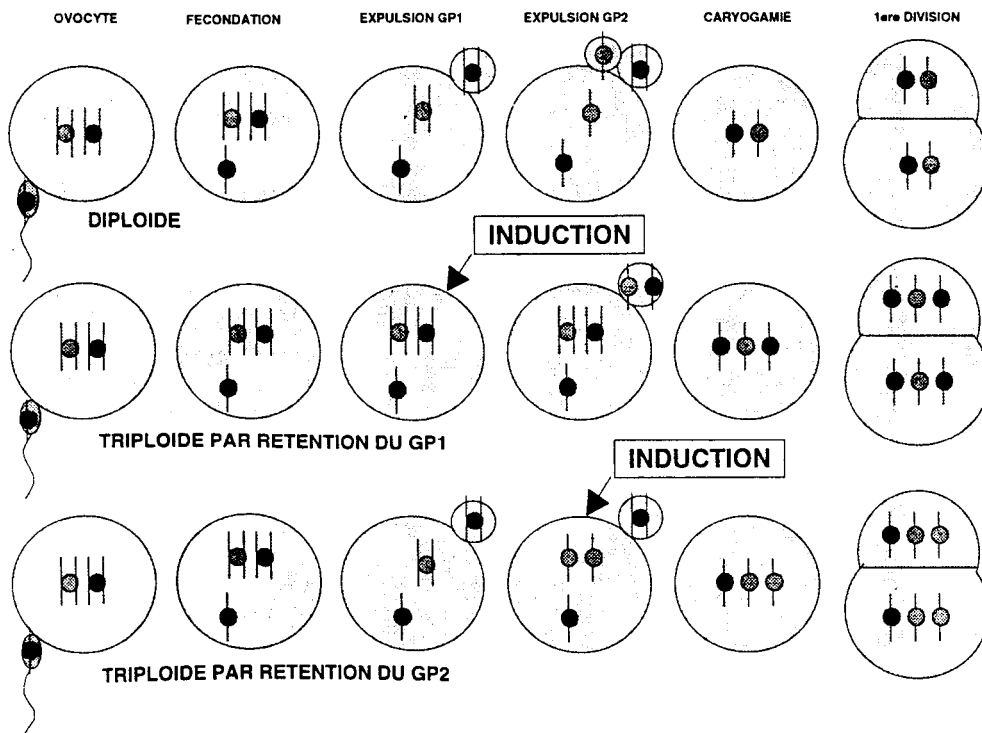
Tabarini, C.L., 1984. Induced triploidy in the bay scallop, *Argopecten irradians*, and its effect on growth and gametogenesis. *Aquaculture*, 42 : 151-160.

Fig.1 : Evolution du poids sec de *Crassostrea gigas* à Marennes-Oléron



(D'après Deslous-Paoli et Héral, 1988)

Fig.2 : Induction de la triploïdie



**Fig.3 : Induction de la triploïdie
Comparaison 6-DMAP et CB**

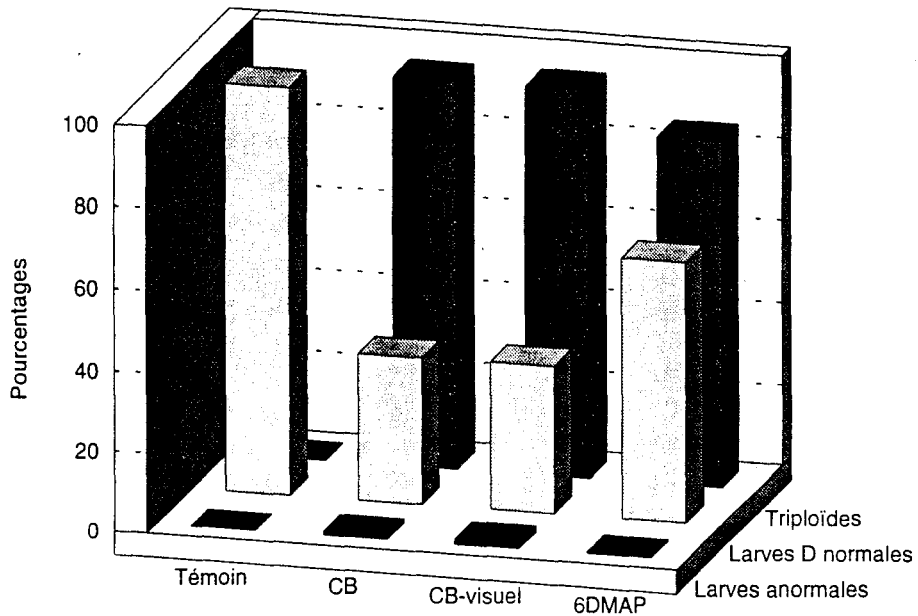


Fig.4 : Configuration du système Samba de TITN Answare Alcatel

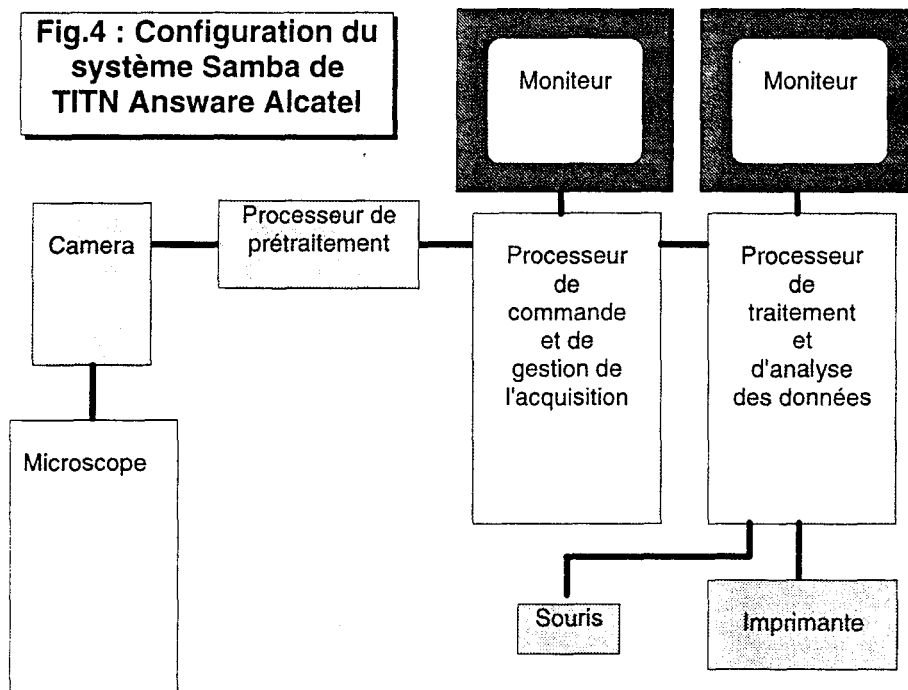


Fig.5 : Contrôle de la ploïdie par imagerie numérique sur une huître adulte triploïde

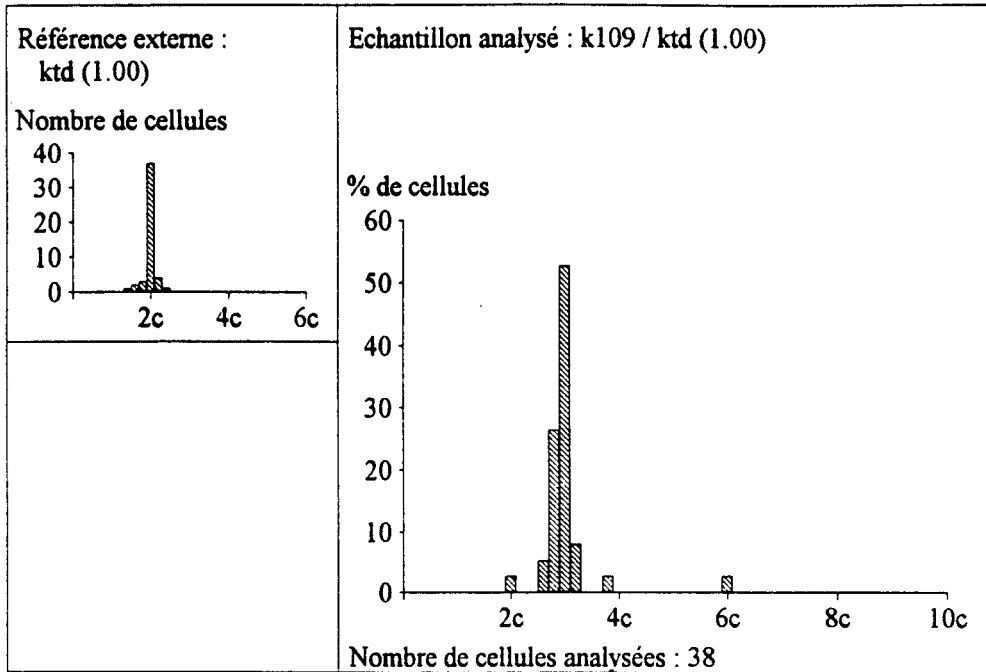


Fig.6 : Contrôle de la ploïdie par imagerie numérique sur un lot de larves

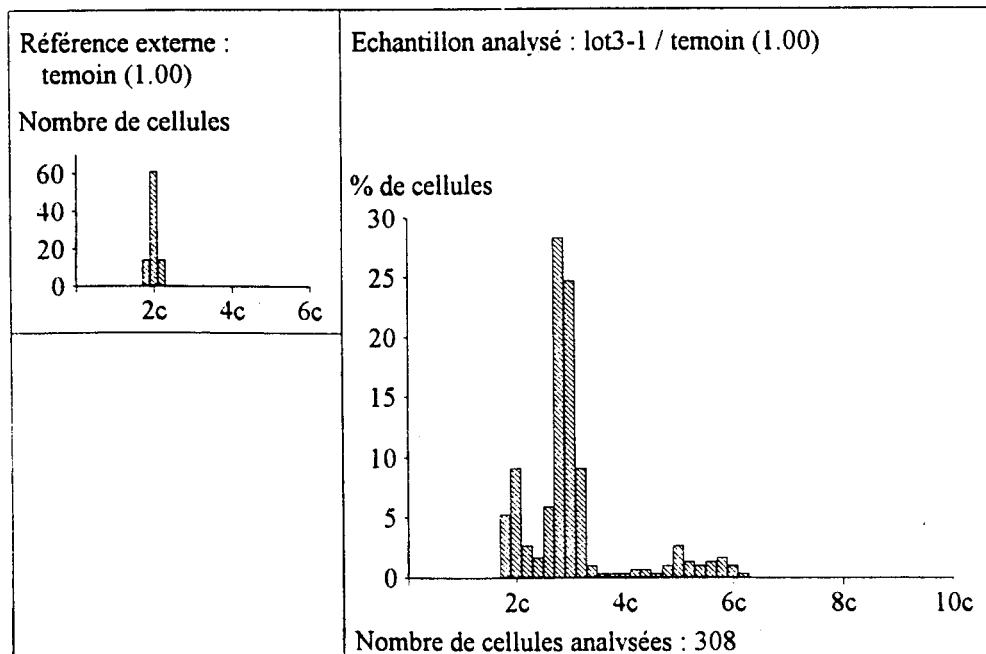


Fig. 7 : Réseau Génétique Mollusques IFREMER

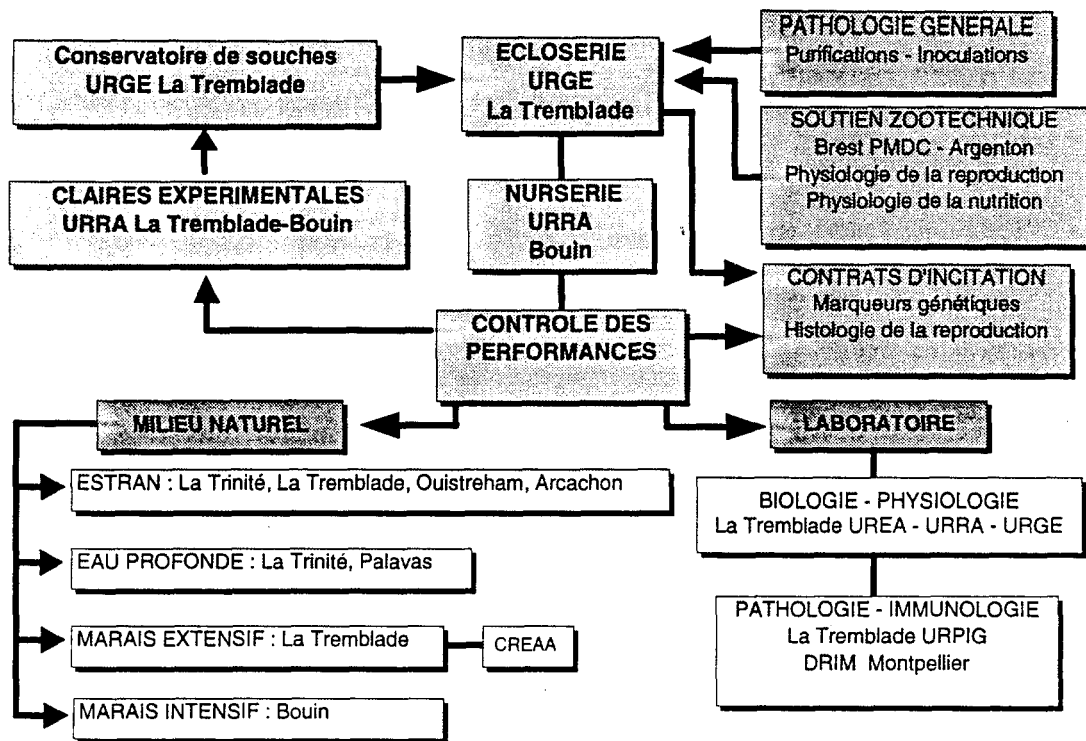
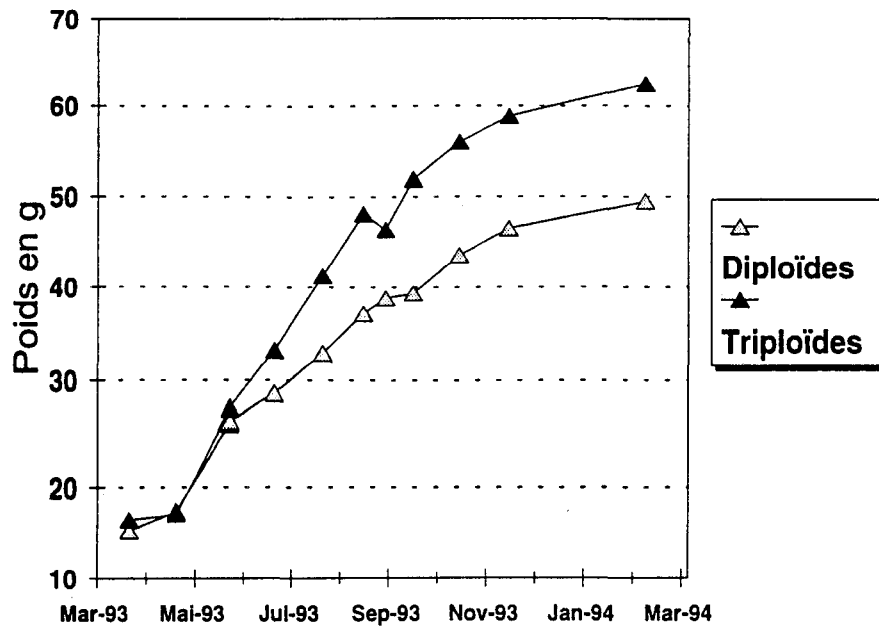
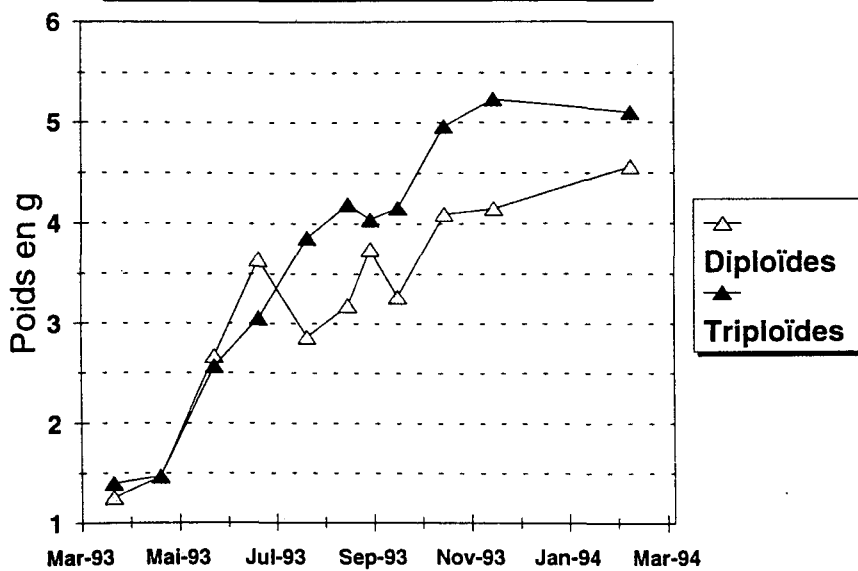


Fig. 8 : *Crassostrea gigas*
Evolution du poids total



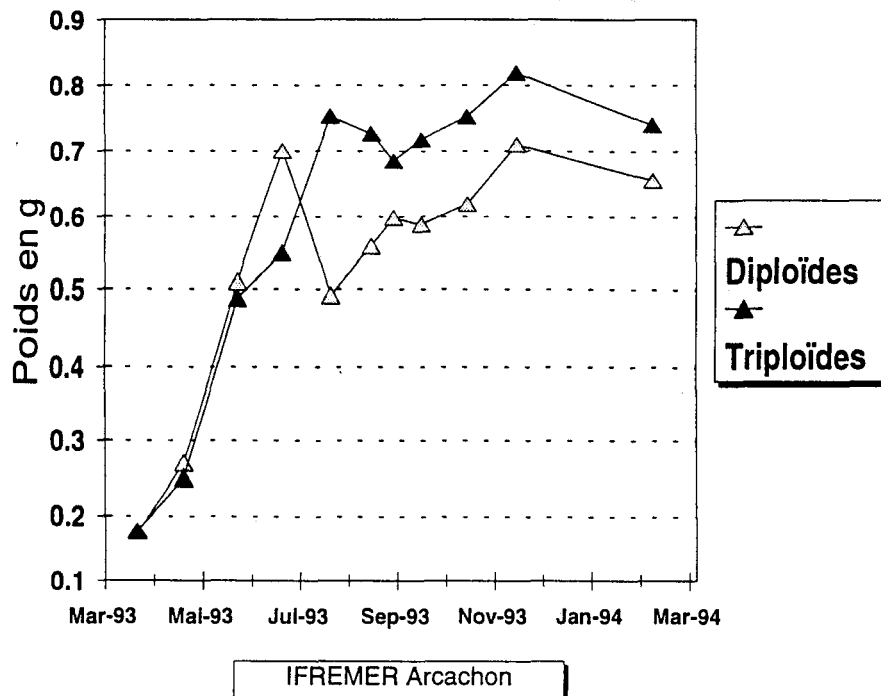
IFREMER Arcachon

Fig. 9 : *Crassostrea gigas*
Evolution du poids frais de chair

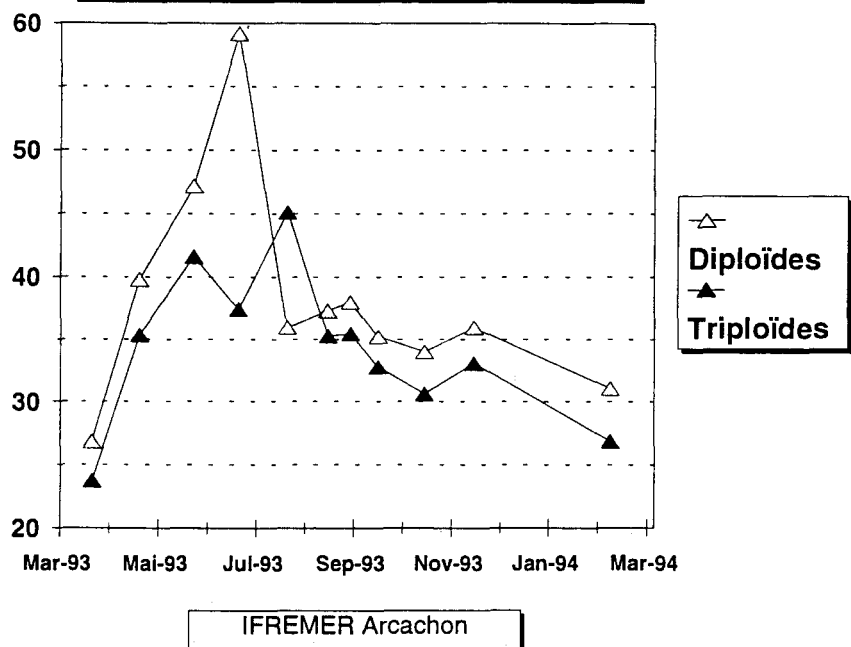


IFREMER Arcachon

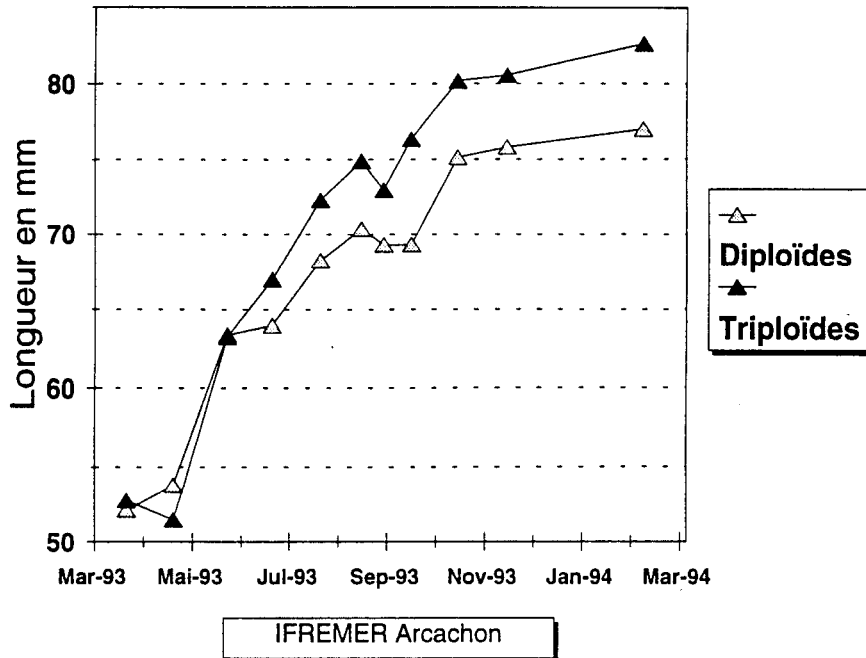
**Fig. 10 : *Crassostrea gigas*
Evolution du poids de chair sèche**



**Fig. 11 : *Crassostrea gigas*
Evolution de l'indice de condition**



**Fig. 12 : *Crassostrea gigas*
Evolution de la longueur**



**Fig. 13 : *Crassostrea gigas*
Evolution du taux de triploïdes**

